

University of Groningen

Multidrug and peptide export in *Lactococcus lactis*

Berg van Saparoea, Hendrik Bart van den

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Berg van Saparoea, H. B. V. D. (2009). *Multidrug and peptide export in Lactococcus lactis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

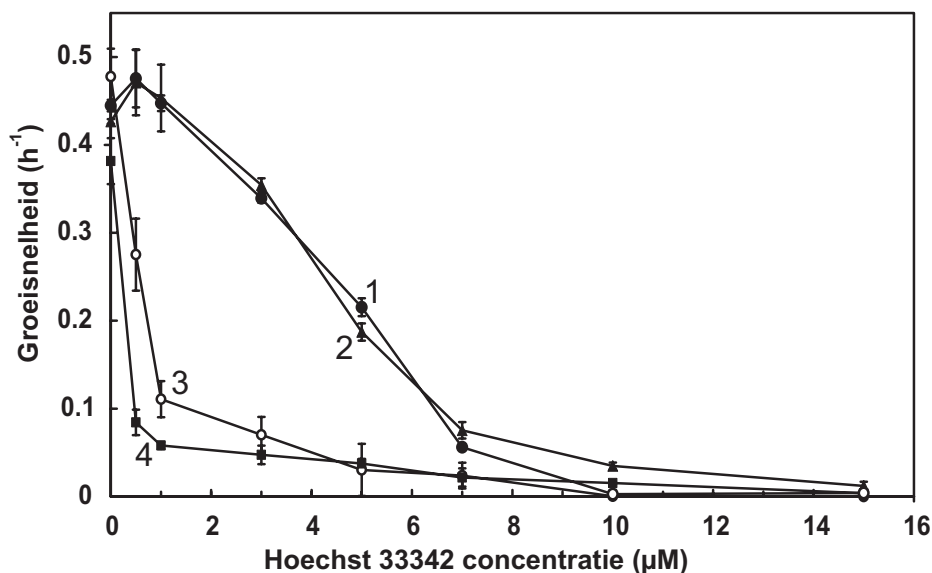
Chapter 7

Samenvatting in het Nederlands (Summary in Dutch)

H. Bart van den Berg van Saparoea and Arnold J.M. Driessen

Het vermogen om een scala aan hydrofobe stoffen die niet verwant zijn qua (chemische) structuur uit te scheiden is onderdeel van een reeks van strategieën die door micro-organismen wordt gebruikt om de negatieve effecten van dergelijke toxische moleculen in hun omgeving te weerstaan. Ziekteverwekkende micro-organismen gebruiken dezelfde mechanismen om resistentie tegen meerdere antibiotica tegelijkertijd te ontwikkelen. Dit fenomeen beperkt de mogelijkheden om bij de behandeling van infecties naar alternatieve antibiotica over te stappen wanneer een bepaald antibioticum niet effectief blijkt te zijn en dit vormt een groot probleem voor de gezondheidszorg. Het ontwikkelen van deze *multidrugresistentie* (MDR) is eveneens een belangrijke oorzaak van het falen van chemotherapie ter bestrijding van kanker. Deze vorm van resistentie wordt veroorzaakt door MDR-transporteiwitten die verwant zijn aan en een soortgelijke werking hebben als de bacteriële MDR-transporteiwitten. Eerdere studies hebben aangetoond dat de melkzuurbacterie *Lactococcus lactis* onder laboratoriumomstandigheden eenvoudig resistentie ontwikkelt tegen giftige stoffen als ethidium, daunomycine, en rhodamine 6G (22). Dit organisme komt deze stoffen normaliter niet tegen in haar natuurlijke omgeving, maar blijktbaar wekt de blootstelling hieraan een beschermingsmechanisme op dat waarschijnlijk een rol speelt in de algemene resistentie van *L. lactis* tegen schadelijke stoffen. Hoewel iedere aangepaste stam afzonderlijk was geselecteerd op resistentie tegen één van de giftige stoffen, vertoonden alle drie verkregen stammen het MDR-fenotype. Dat wil zeggen, een verhoogde resistentie voor meerdere, qua structuur betreft onverwante, toxische stoffen.

Voordat de genetische basis van het MDR-fenotype in *L. lactis* werd ontdekt, zijn er vier genen uit het genoom van *L. lactis* gekarakteriseerd die coderen voor MDR-transporteiwitten, te weten *lmrP*, *lmrA*, *lmrC* en *lmrD* (4;5;7). *LmrA* is een ABC-type half-transporteiwit dat geacht wordt te werken in de vorm van een homodimeer. *LmrC* en *LmrD* zijn eveneens ABC-type half-transporteiwitten, maar deze werken samen in de vorm van een heterodimeer. *LmrP* behoort tot de *major facilitator superfamily* en werkt als een drug/H⁺ antiporteiwit. Wanneer *LmrA* tot expressie wordt gebracht in de darmbacterie *Escherichia coli* of in humane long-fibroblast cellen, verleent het resistentie tegen een brede reeks toxische stoffen (5;28;31). Echter, wanneer hetzelfde *lmrA* gen in haar natuurlijke gastheer *L. lactis* tot overexpressie wordt gebracht, of wordt uitgeschakeld, dan wordt er geen specifiek fenotype in de *multidrugresistentie* waargenomen (een voorbeeld van Hoechst 33342-resistentie is weergegeven in Figuur 7.1) (46). Dit suggereert dat *LmrA* een andere rol heeft dan in MDR, of wijst erop dat andere



Figuur 7.1. Resistentie van *Lactococcus lactis* voor Hoechst 33342. *L. lactis* NZ9000 $\Delta lmrA \Delta lmrCD$ die LmrA (4) of LmrCD (2) tot expressie brengen, controlecellen die het controleplasmide bevatten (3), of *L. lactis* NZ9000 die het controleplasmide bevat (1), zijn gegroeid in aanwezigheid van verschillende concentraties Hoechst 33342. De groeisnelheid (μ) in de exponentiële groeifase werd bepaald en uitgezet als functie van de Hoechst 33342 concentratie. De datapunten geven het gemiddelde van drie experimenten aan. De foutbalken geven de standaarddeviatie aan.

MDR-transporteiwitten hierin een meer uitgesproken rol spelen.

Verschillende eukaryote organismen of cellen (Aziatische korfmossel, gewone mossel en menselijke tumor cellen) verhogen de expressie van ABC-type MDR-transporteiwitten wanneer zij worden blootgesteld aan zware metalen. Dit suggereert dat dit type MDR-transporteiwitten mogelijk ook betrokken is bij resistentie tegen zware metalen. De in Hoofdstuk 2 beschreven studies laten zien dat de drie onderzochte MDR-transporteiwitten resistentie verschaffen aan *E. coli* voor cadmium. Ook de expressie van LmrA in *E. coli* resulteert in een verhoogde resistentie voor cadmium (Hoofdstuk 2). Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor het aan LmrA homologe eiwit OmrA van de melkzuurbacterie *Oenococcus oeni*, die verantwoordelijk is voor de malolactische (appelzuur) fermentatie bij wijnproductie, en MDR1 (ABCB1 of P-glycoproteïne), een menselijk MDR-transporteiwit. De aanwezigheid van verapamil, een bekende antagonist van MDR-transporteiwitten, doet dit effect volledig teniet, wat aangeeft dat de toename in cadmiumresistentie direct gerelateerd is aan de transportactiviteit van deze eiwitten. Deze toename in resistentie lijkt het gevolg te zijn van de secretie van cadmium uit de cel, omdat er minder cadmium geassocieerd is met cellen die de verschillende MDR-transporteiwitten tot expressie brengen dan met controle cellen. Het transport van cadmium door LmrA is op een directere manier aangetoond met opname-experimenten waarbij

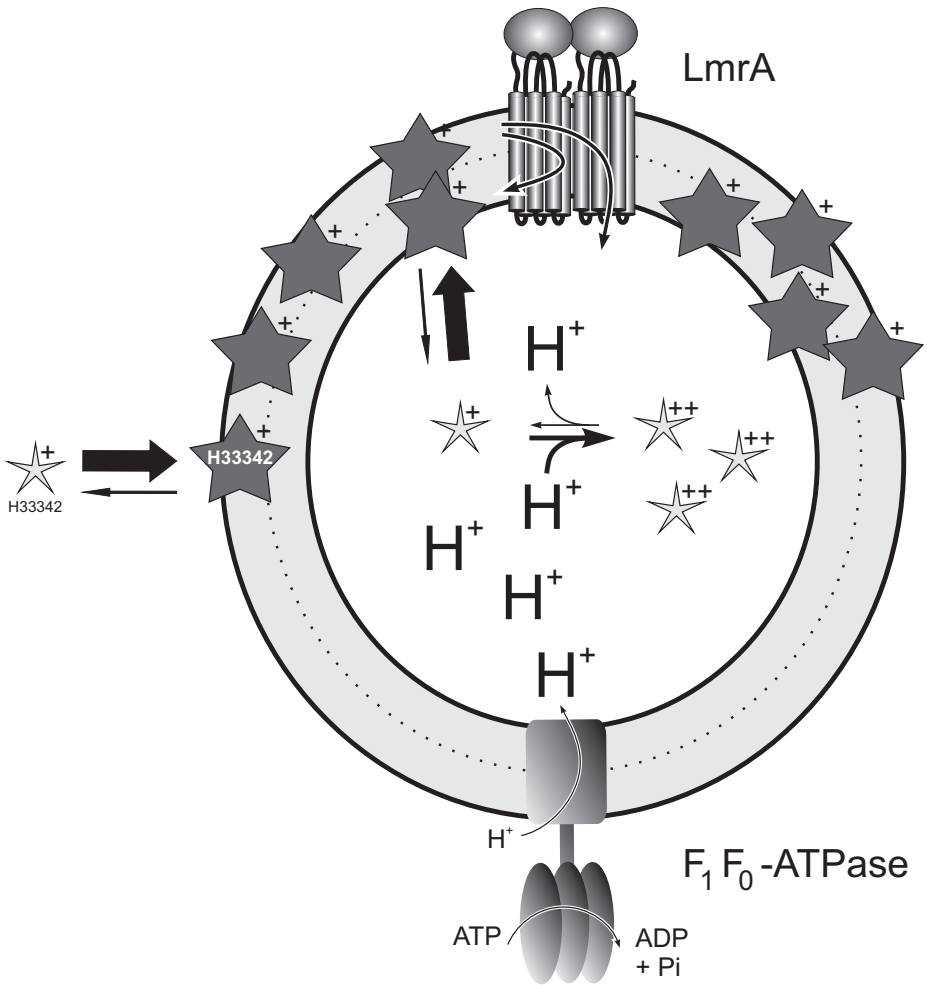
gebruik is gemaakt van binnenstebuiten-gekeerde membraanblaasjes. Hoewel bij deze experimenten een aanzienlijke opnameactiviteit werd gezien in controle membraanblaasjes die geen *LmrA* bevatten, wat de aanwezigheid van endogene cadmiumsecretiemechanismen suggereert, werd er ook een *LmrA*-afhankelijke cadmiumopname waargenomen. Deze opnameactiviteit was vier maal hoger wanneer ook glutathion in de test aanwezig was. Onder deze omstandigheden wordt cadmium waarschijnlijk door *LmrA* getransporteerd in de vorm van een glutathion-cadmium complex. Het kan zijn dat *LmrA* op vergelijkbare wijze een ATP-cadmiumcomplex transporteert, in plaats van het vrije cadmiumion, wanneer er geen glutathion aanwezig is. In de test was er veertigmaal zoveel ATP aanwezig als cadmium. Of *LmrA* een belangrijke factor vormt in de intrinsieke resistentie van *L. lactis* voor zware metalen moet nog worden vastgesteld, maar dit lijkt discutabel gezien de hoge cadmiumopnameactiviteit die wordt waargenomen in controle-membraanblaasjes. De systemen die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn waarschijnlijk meer gespecialiseerd en efficiënter in het uitscheiden van zware metalen dan *LmrA*, dat in deze studies in hoge hoeveelheden aanwezig was. Het is onbekend of de gevoeligheid van *L. lactis* voor zware metalen verandert wanneer het *lmrA*-gen wordt uitgeschakeld.

De ABC-type (half)transporteiwitten *LmrC* en *LmrD* worden gecodeerd door een enkel operon in het genoom van *L. lactis* en vormen een heterodimerisch MDR-transporteiwit (4). Uitschakeling van de *lmrC* en *lmrD*-genen leidt tot een toename in de gevoeligheid voor verschillende toxische stoffen en vermindert het vermogen van cellen om deze stoffen uit te scheiden (14). Het idee dat *LmrCD* een belangrijke rol speelt in het drugresistentie fenotype van *L. lactis* wordt verder ondersteund door de waarneming dat transcriptie van de *lmrCD*-genen wordt verhoogd wanneer de cellen in aanraking komen met Hoechst 33342, daunomycine (42), of cholaat (45). Analyse van het transcriptieprofiel en de regulatie van alle potentiële en gekarakteriseerde MDR-transporteiwitcoderende genen in *L. lactis* zou daarom een diagnostisch middel kunnen zijn om te bepalen welke van deze genen daadwerkelijk betrokken zijn bij drugresistentie. Dit soort studies zou ook aanwijzingen kunnen opleveren over het substraatspectrum van het respectievelijke transporteiwit. Hoe de expressie van andere potentiële MDR-transporteiwitten in *L. lactis* wordt gereguleerd is op dit moment niet bekend. Northern-analyse laat zien dat de *lmrP* en *lmrA* genen tot expressie komen in de *L. lactis*-stam MG1363, maar niet in de stam IL1403 (49). Een andere vraag, wat dit betreft, is of de expressie van *lmrP* en/of *lmrA* verandert, wanneer *L. lactis* cellen in contact komen met een van de bekende substraten van *LmrP* of *LmrA*, bijvoorbeeld ethidium of Hoechst 33342. De expressie van deze genen verandert echter niet bij contact met deze twee toxische stoffen (R. van Merkerk, niet gepubliceerde resultaten).

Ethidium is een belangrijk substraat geweest bij het karakteriseren van *LmrP*, waarbij consequent een sterke, *LmrP*-afhankelijke ethidiumsecretieactiviteit werd waargenomen. Eveneens verleent de expressie van *LmrP* resistentie tegen ethidium aan zowel *E. coli* als aan *L. lactis*. Aan de ander kant is nog niet met zekerheid vastgesteld of *LmrP* daadwerkelijk betrokken is bij de intrinsieke resistentie van *L. lactis* voor ethidium. Deletie van het *lmrP*-gen heeft slechts een

marginaal effect op het ethidiumresistentiefenotype van *L. lactis* (7), wat verband zou kunnen houden met de waarneming dat *lmrP* alleen in de laatexponentiële groeifase tot expressie komt. Het kan ook zijn dat andere transporteiwitten een belangrijkere rol spelen in ethidiumsecretie, bijvoorbeeld LmrCD. Deletie van de *lmrCD*-genen heeft een sterk effect op de intrinsieke resistentie van *L. lactis* voor ethidium. *L. lactis*cellen die LmrP tot overexpressie brengen, vertonen een verlaagde groeisnelheid (Hoofdstuk 4). Dit effect op de groeisnelheid wordt tenietgedaan door verapamil, wat suggereert dat het veroorzaakt wordt door de transportactiviteit van LmrP. Het is mogelijk dat, onder de conditie van overexpressie, LmrP essentiële, cellulaire metabolieten uitscheidt, de *proton motive force* (protonpotentiaal) verzwakt door protontranslocatie de cel in, of de influx van (cytotoxische) extracellulaire stoffen faciliteert. Het groeiremmende effect was sterker in cellen die een energie-ontkoppelde mutant van LmrP, D68C-C270A LmrP, tot expressie brachten. Dit eiwit is niet meer in staat om substraat in een specifieke richting te transporteren, en faciliteert alleen nog maar de diffusie van substraat over het membraan, los (ontkoppeld) van de protonengradiënt. Expressie van D68C-C270A-LmrP leidt tot een toename in de gevoeligheid van cellen voor ethidium. Deze mutant faciliteert ook de influx van Hoechst 33342 in cellen en maakt cellen overgevoelig voor deze stof. Aan de andere kant leidt overexpressie van wildtype-LmrP niet tot een toename van de resistentie van cellen voor Hoechst 33342. Het verhoogt ook niet de efflux van Hoechst 33342 uit cellen waarin de *lmrC* en *lmrD*-genen zijn uitgeschakeld. Dit resultaat is opmerkelijk, omdat in membraanblaasjes consequent een sterke, LmrP-afhankelijke Hoechst 33342-transportactiviteit wordt waargenomen, en geeft aan dat Hoechst 33342 geen echt substraat lijkt te zijn voor LmrP.

Gezien de hierboven beschreven waarnemingen is het de vraag of Hoechst 33342-transport in membraanblaasjes een betrouwbare indicator is voor MDR-transportactiviteit. Dit wordt versterkt door de resultaten van studies aan LmrA (Hoofdstuk 3). Net als met LmrP wordt er een sterke, LmrA-afhankelijke Hoechst 33342-transportactiviteit waargenomen in membraanblaasjes. Dit transport wordt echter volledig tenietgedaan door dissipatie van de protongradiënt over het membraan of wanneer de opbouw van deze gradiënt wordt voorkomen. Opmerkelijk genoeg is het transport niet afhankelijk van de ATPase-activiteit van LmrA. Deze data laten duidelijk zien dat het LmrA-afhankelijke Hoechst 33342-transport in membraanblaasjes geen echte secretieactiviteit is van een ABC-type MDR transporteiwit. Dat dit Hoechst 33342-transport afhankelijk is van de protongradiënt suggereert dat de protonconcentratie het proces beïnvloedt. De verdeling van Hoechst 33342 over het membraan en het omgevende medium hangt inderdaad sterk af van de pH. In aanwezigheid van liposomen wordt een afname in fluorescentie van Hoechst 33342 waargenomen wanneer de pH van het omgevende medium daalt van 8.0 naar 5.25. Hoewel deze experimenten niet op een directe manier de verdeling over membraan en waterfase meten, wordt de pH-afhankelijkheid van de Hoechst 33342-fluorescentie meest waarschijnlijk veroorzaakt door een lagere membraan/medium-verdeling van de geprotoneerde vorm van Hoechst 33342. Wanneer ATP wordt toegevoegd aan binnenstebuitengekeerde membraanblaasjes,



Figuur 7.2. Model voor de LmrA-afhankelijke Hoechst 33342-transportactiviteit in membraanblaasjes. Hoechst 33342 dat wordt toegevoegd aan binnenstebuiten-gekeerde membraanblaasjes verdeelt zich snel over de waterfase en de buitenste laag van het membraan, wat resulteert in een hoge fluorescentie (grijze Hoechst 33342 moleculen). LmrA, aanwezig in hoge hoeveelheden (tot 30% van het eiwittotaal) in de membraanblaasjes, faciliteert een flip-flop-beweging van Hoechst 33342 naar de binnenste laag van het membraan of van het membraan naar de waterfase binnenin het blaasje op een ATP-onafhankelijke wijze. Wanneer ATP wordt toegevoegd, genereert F₁F₀-ATPase een protongradiënt over het membraan (lage pH binnen). Aan de binnenkant van het blaasje zorgt de lage pH voor een verdere protonering van Hoechst 33342, waardoor de verdeling van Hoechst 33342 verschuift van het membraan naar de waterfase (witte Hoechst 33342 moleculen) met een vermindering van fluorescentie als resultaat.

genereert het F_1F_0 -ATPase een protongradiënt over het membraan (lage pH binnen). Aan de binnenkant van het blaasje zorgt de verlaging van de pH voor een verandering in de verdeling van Hoechst 33342, waarbij meer Hoechst 33342 in de waterfase terecht komt, wat gepaard gaat met een verlaging van fluorescentie. LmrA, dat in hoge hoeveelheden aanwezig is (tot 30% van het eiwittotaal), zou de beweging van Hoechst 33342 tussen de twee zijden van het membraan en van het membraan naar de waterfase kunnen vergemakkelijken (Figuur 7.2). De eerder genoemde waarnemingen suggereren dat Hoechst 33342 ook geen echt substraat is van LmrA. Dit idee wordt versterkt door de waarneming dat bij intacte cellen, zowel onder niet-geënergeerde als onder geënergeerde condities, LmrA de influx van deze DNA-kleurstof faciliteert. In plaats van resistentie voor Hoechst 33342 te verschaffen aan overgevoelige *L. lactis* $\Delta lmrA \Delta lmrCD$ -cellen, maakte de expressie van LmrA de cellen gevoeliger voor deze stof. Concluderend kan worden gesteld dat Hoechst 33342-transport in membraanblaasjes geen betrouwbare indicator is voor MDR-transport, tenzij er duidelijk bewijs is dat de expressie van het bestudeerde transporteiwit een verhoogde resistentie voor deze stof geeft aan cellen. Een voorbeeld hiervan is LmrCD-afhankelijk Hoechst 33342-transport. Deze transportactiviteit in membraanblaasjes is maar zeer licht gevoelig voor de dissipatie van de protongradiënt en is afhankelijk van de ATPase-activiteit van LmrCD. Bovendien herstelt expressie van *lmrCD* vanaf een plasmide de resistentie voor Hoechst 33342 van *L. lactis* $\Delta lmrA \Delta lmrCD$ -cellen volledig tot het wildtype niveau. Deze experimenten hingen niet af van hoge overexpressie van het LmrCD transporteiwit. Wildtype niveaus lijken voldoende om de cellen een verhoogde resistentie te geven voor Hoechst 33342. Deze waarnemingen laten zien dat Hoechst 33342 een echt substraat is van LmrCD, en benadrukken verder dat het moeilijk is de betrouwbaarheid van Hoechst 33342 als substraat te voorspellen, wanneer alleen transportexperimenten met membraanblaasjes worden gebruikt. In het algemeen geldt dat Hoechst 33342-transportexperimenten met terughoudendheid zouden moeten worden geïnterpreteerd wanneer de schijnbare transportactiviteit afhangt van een hoog overexpressieniveau van het bestudeerde MDR-transporteiwit.

De bovenstaande studies brengen de rol van LmrA in MDR in *L. lactis* in twijfel, maar vanwege het ontbreken van een fenotype van de *lmrA*-gendeletie in *L. lactis* is het moeilijk een alternatieve functie van LmrA te onderzoeken. Het is aangetoond dat LmrA in *L. lactis* resistentie geeft voor de bacteriocines LsbA en LsbB (49). Bovendien kan LmrA het homologe ABC-type-transporteiwit LmrB, dat verantwoordelijk is voor de secretie en immuniteit voor deze bacteriocines, in functionele zin vervangen. Toekomstige experimenten zouden daarom een potentiële rol van LmrA in de resistentie van *L. lactis* voor antimicrobiële peptiden moeten onderzoeken.

Het best bestudeerde, door melkzuur bacteriën geproduceerde antimicrobiële peptide is het lantibioticum nisine A. Haar structuur wordt bepaald door de ongewone, biochemisch stabiele thioetherbruggen. Deze thioetherbruggen worden door de enzymen NisB en NisC aangebracht in het NisA peptide na synthese door het ribosoom. Hoewel alle door de *nis*-genencluster gecodeerde eiwitten gewijd zijn aan de synthese van en immuniteit voor nisine A, kunnen

deze enzymen ook thioetherbruggen aanbrengen in andere peptiden (63). NisT is een ABC-type transporteiwit dat gewijd is aan de productie van nisine A, maar het lijkt een brede substraatspecificiteit te hebben. Het kan verschillende gemodificeerde eiwitten transporteren, mits deze met de nisine A signaalsequentie gefuseerd zijn. Deze promiscuïteit van de enzymen en het transporteiwit zou de mogelijkheid kunnen openen om specifieke, intramoleculaire thioetherbruggen aan te brengen in willekeurige peptiden, en de productie hiervan te koppelen aan secretie in het externe medium. In Hoofdstuk 5 is een kwantitatieve bepaling gepresenteerd van de bijdrage van NisB, NisC, en NisT aan de productie van pre-nisine door *L. lactis*. Het dehydratase NisB katalyseert de eerste stap in het posttranslationale modificatieproces, de dehydratatie van serine- en threonineresiduen in het peptide. Het cyclase NisC katalyseert de tweede stap, de vorming van thioetherbruggen door de vrije thiolgroep van cysteïnes te koppelen aan dehydroresiduen binnen hetzelfde peptide. Het gemodificeerde peptide wordt over het membraan getransporteerd door NisT. Aan de buitenkant van de cel wordt het peptide gesplitst door het protease NisP, waarbij signaalpeptide en het lantibioticum nisine A vrijkomt. De voorloper van het nisine A peptide (pre-nisine) wordt waargenomen in het medium voordat deze proteolyse plaatsvindt, wat aangeeft dat transport en afsplitsing van het signaalpeptide niet aan elkaar gekoppeld zijn.

De productie van pre-nisine is sterk afhankelijk van het dehydratase NisB. Wanneer dit enzym afwezig is, wordt vrijwel geen productie van pre-nisine waargenomen. NisT alleen, of NisT in combinatie met NisC, resulteert niet in een efficiënte productie van het peptide. Aan de andere kant resulteert het ontbreken van NisC in een kleiner effect (een 70% reductie) op de productie van pre-nisine, wat aangeeft dat NisB samen met het transporteiwit NisT een aanzienlijke productie van het peptide ondersteunt. Zonder NisT wordt geen secretie waargenomen, maar expressie van *nisABC* resulteert wel in een aanmerkelijke verlaging van de groeisnelheid van de cellen. Het gemodificeerde peptide dat geproduceerd wordt door NisBC bevat een signaalpeptide en zou daarom geen antimicrobiële activiteit moeten vertonen. Proteolyse van het peptide dat zich in de cel ophoopt maakt echter actief nisine A vrij, wat waarschijnlijk de verlaging in de groeisnelheid veroorzaakt. Aangezien NisB belangrijk is voor effectieve productie van pre-nisine, stellen we een geleidingsmechanisme voor waarbij pre-nisine door het NisBCT eiwitcomplex geleid wordt. In dit model is NisB de centrale component. Volgens deze hypothese zal de signaalsequentie het NisA peptide naar NisB in het NisBCT-complex, dat zich bij het membraan bevindt, sturen. Eenmaal aan NisB gebonden zal het peptide op efficiënte wijze doorgegeven worden via de modificerende enzymen naar het transporteiwit om zo uiteindelijk uitgescheiden te worden door de cel. Het moet gezegd worden dat in de in Hoofdstuk 5 beschreven analyse de productie van verschillende, hoewel gelijkende, peptiden wordt vergeleken. Afhankelijk van de aan- of afwezigheid van NisB en NisC wordt ongemodificeerd, gedehydrateerd, of gedehydrateerd en gecycliseerd NisA uitgescheiden door NisT. Eenzelfde studie, waarbij peptiden worden gebruikt die niet door de enzymen NisB en NisC worden gemodificeerd, zou daarom meer inzicht kunnen verschaffen in het geleidingsmechanisme door

het NisBCT-complex zoals hier wordt voorgesteld. Lantibioticum-biosynthese-enzymen zouden kunnen worden ingezet voor de synthese van nieuwe gemodificeerde peptiden, bijvoorbeeld nieuwe of verbeterde antimicrobiële of chemotherapeutische peptiden. Bij het toekomstige rationeel ontwerp dat dit zal vergen is een uitgebreide kennis van het moleculaire mechanisme van het nisine-A-biosynthese-eiwitcomplex van zeer groot belang.